

(19)대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)

(51) . Int. Cl.⁷
G01N 33/543

(11) 공개번호 10-2004-0007115
(43) 공개일자 2004년01월24일

(21) 출원번호 10-2002-0041770
(22) 출원일자 2002년07월16일

(71) 출원인 프로테오젠(주)
서울 서초구 양재2동 275-2 윈드스톤오피스텔 1516호

(72) 발명자 한문희
대전광역시동구용전동1번지신동아아파트8동1003호

강인철
경기도수원시팔달구인계동선경3차아파트307동902호

이윤석
강원도춘천시칠전동대우2차아파트209-302호

이은경
강원도춘천시퇴계동현대아파트104동404호

(74) 대리인 이상용
류완수
구현서

심사청구 : 있음

BEST AVAILABLE COPY

(54) 단백질 칩 및 그 제조방법 및 그 단백질 칩을 이용한감지방법

요약

본 발명은 단백질 칩 및 그 제조방법 및 그 단백질 칩을 이용한 감지방법에 관한 발명이다.

본 발명은 특정한 기질(substrate), 즉 유리나 금속에 신물질인 칼릭스아렌(calixarene) 유도체를 합성한 코팅(coating)한 것으로 단백질이 균일하고 높은 활성도(activity)를 유지할 수 있다. 이 위에 수 백, 수 만개의 단백질을 고밀도 배열하여 많은 종류의 단백질간의 발현 양상을 탐색할 수 있으며, 단백질의 발현해석, 의약품의 스크린 및 질환 진단 용 등으로 응용될 수 있는 단백질 칩의 최적의 베이스 플레이트로 사용될 수 있다.

대표도

도 2

명세서

도면의 간단한 설명

도 1은 본 발명에 코팅된 칼릭스 크라운 유도체의 분자구조를 보여주는 그림.

도 2는 본 발명에 제조과정과 단백질 분석방법의 예를 보여주는 그림.

도 3은 본 발명을 이용, 단백질의 고정화 정도를 테스트 한 결과를 보여주는 그림.

도 4은 본 발명을 이용, 항원· 항체를 테스트 한 결과를 보여주는 그림.

도 5는 본 발명을 이용, 단백질의 발현을 샌드위치 방법(sandwich method)의 도식도와 결과를 보여주는 그림.

도 6는 본 발명의 단백질 고정화 원리와 산업기에 따른 단백질 고정화 정도의 결과를 보여주는 그림.

도 7은 단백질을 희석한 용액의 이온농도와 종류에 따라 단백질이 기질 고정화에 영향을 주는지 여부를 실험한 결과를 보여주는 사진.

도 8은 본 발명의 비특이성을 테스트한 결과를 보여주는 그림.

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 단백질 칩 및 그 제조방법 및 그 단백질 칩을 이용한 감지방법에 관한 발명으로 단백질을 특정기질에 고정화시킬 수 있는 단백질 베이스 플레이트에 미량의 단백질만을 사용, 단백질간의 상호작용 및 다양한 발현패턴이 분석이 가능하다.

최근 지노믹스(genomics) 연구를 통하여 인간의 유전자 정보 등이 밝혀졌다. 하지만 우리들이 생각했던 것보다는 인간은 적은 수의 유전자를 가지고 있고 그러므로 유전자정보가 우리에게 줄 수 있는 정보에는 한계가 있다. 이에 많은 사람들이 프로테오믹스(proteomics), 즉 단백질에 더 관심을 가지고 이 쪽에 관한 연구가 활발해지고 있다. 이러한 연구에 핵심이 되는 것 중에 하나가 단백질을 특정한 곳에 고정화시키는 기술이며 이러한 도구로 단백질 칩 기술이 앞으로 많은 발전을 할 것으로 예상된다.

이러한 단백질 칩, 항원, 항체, 그리고 효소 등을 고정화는 단백질 연구 또는 바이오 기술에 있어 가장 핵심이 되는 것 중에 하나이다. 기존의 기술 중에 연구소 또는 병원 등에서 진단을 목적으로 상용화되어 널리 쓰이는 기술 중에 하나가 효소면역항체법(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)이다. 최근에 들어 단백질 칩 분야가 발전하면서 고체기질에 단백질과 기질간에 연결 역할을 하는 물질에 바이오 기술들이 관심을 가지고 발전이 되어왔다. 그러한 예들로 콜라겐(collagen), 덱스트란(dextran), 그리고 셀룰로오스(cellulose)와 같은 생고 분자(biopolymer)이고 다른 예로 고체기질과 단백질간에 공유결합(covalent bond)을 이용하여 단백질을 고정화시키고 있다. 하지만 이와 같은 기술들은 몇 가지 아래와 같은 곤란한 문제점들을 가지고 있다.

첫째, 단백질을 고체 기질 표면에 고정화시키는데 가장 중요한 문제는 고정화되는 단백질의 양이다. 기존의 방법들은 그 양이 매우 적다. 이와 같이 고체 기질에 고정화되는 단백질의 양이 적은 경우 다른 단백질이 고정화되는 비특이성 결합(non-specific binding)이 일어날 수 있다. 그래서 기질 표면에서 비특이성 결합을 막기 위해 화학적 처리를 하지만 이 경우 단백질들의 활성이 감소 또는 변성(denaturation)을 가져오게 된다.

기존 방법의 경우 이와 같은 적은 양의 단백질들이 고정화되는 것을 막기 위해 필요 이상의 많은 단백질 양을 사용하므로 측정 또는 연구하는데 많은 비용이 쓰여진다.

둘째, 기존의 단백질의 고정화시키는 방법은 주로 화학적인 결합 또는 물리적인 흡착을 통하여 고체 기질 표면에 고정화시키고 있다. 그러나 고정화된 단백질들은 일반적으로 용액 안에 있는 단백질보다는 활성도가 떨어지게 된다. 이것은 형태(conformation)의 변화로 활성을 잃어버리거나, 기질 표면에 화학적 또는 물리적으로 강하게 결합되어 단백질의 변성을 가져오기 때문이다.

셋째, 단백질간에 상호작용을 하기 위해서는 서로간에 결합하는 활성자리(active site)가 있다. 그러므로 기질 표면에 고정화되는 단백질들의 배향성(orientation) 매우 중요하고 균일한 배향성을 가져야 한다. 하지만 기존의 방법 들은 고정화되는 단백질의 양이 적어 고정화된 단백질들간의 공간이 많고, 기질과의 불규칙적인 결합 위치 등의 문제로 일

정한 배향성을 가지지 못한다.

따라서, 현재의 단백질을 고정화시키고 있는 기질들은 측정 범위에 한계를 가지고 있다.

한편, 국제특허 WO 98/59068에서는 캘릭스 아렌이 시료내의 물질과 복합체를 GD성하는 특성을 이용하여 샘플에 포함되어 있는 물질을 분석하는 방법을 제시하고 있으나 이를 단백질 칩 제조에 직접 이용하는 기술에 대해서는 발표된 것이 없다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명은 상기 문제점을 해결하고, 상기의 필요성에 의하여 안출된 것으로서, 본 발명은 단백질들의 활성을 본래대로 유지시키고, 적은 양만의 단백질을 사용, 기존의 단백질간의 상호작용, 발현 등을 낮은 농도에서도 감지가 가능한 단백질 칩을 제공하는 것이다.

본 발명의 다른 목적은 상기 단백질 칩의 제조방법을 제공하는 것이다.

본 발명의 또 다른 목적은 상기 단백질 칩을 이용한 감지방법을 제공하는 것이다.

발명의 구성 및 작용

상기의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 유리, 금, 플라스틱, 실리콘 와퍼 및 금속으로 구성된 균으로부터 선택된 하나의 기질, 상기 기질 표면에 형성된 캘릭스 크라운 유도체 및 상기 캘릭스 크라운 유도체 상에 고정된 단백질을 포함하는 단백질 칩을 제공한다.

본 발명에 있어서 캘릭스 크라운 유도체는 도 1a의 구조가 바람직하다. 도 1a에서 $m=0-2$, $n=0-2$ 이 더욱 바람직하다. 본 발명에 있어서 캘릭스 크라운 유도체는 도 1a의 구조가 바람직하다. 도 1a에서 $m=0-2$, $n=0-2$ 이 더욱 바람직하다. 또 도 1a의 R_1 은 $-CH_2SH$, $-CHO$, $-CH_2Cl$, $-CH_2CN$, $-CH_2CHO$, $-CH_2NH_2$, $-CH_2COOH$, $-NH_2$, $-NO_2$ R_2 은 $-H$, methyl, ethyl, propyl, isopropyl, isobutyl를 갖는 것이 바람직하고, 상기 캘릭스 크라운 유도체는 화학식 1b 또는 1c 구조를 갖는 것이 더욱 바람직하다.

본 발명에 있어서, 상기의 단백질은 항체, 효소 또는 펩타이드인 것이 바람직하고, 상기의 항체는 단일클로날 항체인 것이 더욱 바람직하다.

또 본 발명은 유리 또는 금 기질 표면에 형성된 캘릭스 크라운 유도체를 처리하는 단계; 및 상기 캘릭스 크라운 유도체 상에 단백질을 고정하는 단계를 포함하는 단백질 칩 제조방법을 제공한다.

본 제조방법에 있어서, 상기 캘릭스 크라운 유도체는 도 1의 구조를 갖는 것이 바람직하고, 상기 캘릭스 크라운 유도체는 화학식 1b 또는 1c인 것이 더욱 바람직하다.

또한 상기 단백질은 항체, 효소 또는 펩타이드인 것이 바람직하며, 상기의 항체는 단일클로날 항체인 것이 더욱 바람직하다.

또한 본 발명은 상기의 본 발명의 단백질 칩에 검사할 단백질을 반응시키는 단계; 상기의 반응체에 형광이 부착된 물질을 처리하는 단계; 및 상기의 형광을 검출하는 단계를 포함하는 단백질 발현 또는 단백질 간의 상호작용 감지방법을 제공한다.

본 발명의 감지방법에 있어서 상기의 단백질 칩은 단일클로날항체가 부착된 칩인 것이 바람직하다.

이하, 본 발명을 상세하게 설명한다.

본 발명은 특수 처리된 유리, 금, 그리고 기타 관련된 고체 기질에 단백질간에 가교 역할을 하는 캘릭스 크라운 유도체의 자기조립단분자층(self-assembled monolayer)을 제조하여 기존의 화학결합, 물리적 흡착 같은 비자발적인 반응과는 전혀 다른 자발적인 반응, 즉 분자인식이라는 새로운 개념으로 단백질을 고정화시키어 기존의 문제점들을 해결하고자 하는데 있다.

즉, 본 발명의 단백질 칩 베이스 플레이트는 유리, 금, 또는 관련된 기타 고체 기질에 자기조립단분자층을 제조하기 위해 캘릭스 크라운 유도체를 코팅시켰다. 이 베이스 플레이트의 캘릭스 크라운 자기조립단분자층은 대부분의 단백질들을 복잡한 과정 없이 간단하고 쉽게 단백질들을 표면에 고정시킬 수 있다. 또한 관련된 많은 종류의 고체 기질에 응용할 수 있다는 점이 커다란 특징이다.

본 발명의 공정과 바람직한 실시 예에 대해 도면을 참고로 하여 자세하게 설명하면 다음과 같다.

도 1은 캘릭스 크라운 유도체의 분자구조를 도식한 것이다.

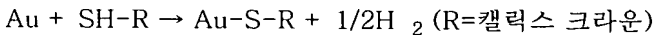
도 2은 캘릭스 크라운 유도체의 자기조립단분자층을 제조하여 본 발명의 제조 과정을 도식한 것과 항원 항체의 상호작용을 도식한 것이다.. 더 자세한 과정은 다음과 같다.

예를 들어 고체 기질이 금(10)인 경우 캘릭스 크라운 유도체(1b)을 유기용매(organic solvent) 클로로포름(chloroform, CHCl_3)에 농도 1-3 밀리 몰농도(mM)에 녹인 후 금 기질을 1-3시간 정도 담가둔다. 만일 고체 기질인 유리(10)인 경우 유리 표면을 알려진 일반적인 방법으로 아민(amine)으로 처리한 후 캘릭스 크라운 유도체(1c)를 같은 용액, 같은 농도에 4-6시간 정도 담가둔다. 그런 다음 클로로포름, 아세톤(acetone), 증류수, 그리고 에탄올(ethanol) 순으로 씻어 준 후 질소(N_2) 또는 아르곤(Ar) 가스로 건조시키면 본 발명품이 제조된다. 이와 같은 방법으로 금 또는 유리 말고도 다양한 고체 기질에 응용할 수 있다.

도 3은 단백질이 발명품 위에 얼마나 고정화되는가를 확인한 결과이다. 이러한 발명품 위에 항원(12)과 항체(13)를 고정화 시켜 단백질간의 상호작용을 관찰할 수 있다. 도 4은 위와 같은 항원, 항체간의 상호작용의 한 실시 예로 본 발명에서 CEA(carcinoembryonic antigen)을 이용하여 형광스캐너로 얻은 결과이다.

도 5a은 단백질의 발현 패턴을 분석하는 한 가지 방법으로 일반적으로 쓰이는 샌드위치 방법(sandwich method)을 도식한 것과 결과이다. 샌드위치 방법은 먼저 본 발명품에 단일클로날항체(20, monoclonal antibody)를 고정화시키고 분석하고자하는 항원(21, antigen)과 반응시킨 뒤 폴리클로날항체(22, polyclonal antibody), 그리고 면역글로불린G(23, immunoglobulinG)에 형광(24)을 붙쳐 결과를 분석하게된다. 5b는 결과 데이터로 β -HCG를 분석한 자료이다.

캘릭스 크라운 유도체(1b)인 경우 고체 기질의 표면과 결합하는 자리에 티올(thiol, -SH)을 가지고 있어 금(Au) 표면과 아래와 같은 반응식으로 금 표면에서 자기조립단분층을 형성하게 된다.



캘릭스 크라운 유도체(1c)인 경우 알데히드(aldehyde, -CHO)기를 가지고 있어 아민 처리된 유리의 아민과 반응하여 이마이드 결합(imide bond)을 하여 캘릭스 크라운 자기조립단분자층이 형성되어 본 발명인 베이스 플레이트가 제조된다.

이와 같이 캘릭스 크라운을 다양한 유도체로의 변환이 가능하기 때문에 예를 금 과 유리 외에도 여러 고체 기질에 이용이 가능하다.

도 6a는 본 발명품이 단백질을 고정화시키는 원리를 도식한 것으로 캘릭스 크라운 유도체의 크라운그룹(crown group)이 일반적인 단백질들의 활성자리 반대의 일반적으로 중성상태에서 양이온(cation)인 암모니움 이온(amoniun ion, NH_3^+)을 인식하게 되어 단백질의 고정화가 이루어진다. 6b는 산염기를 조절하여 본 발명품 표면에 붙는 1차 단백질 농도에 따른 고정화정도를 측정하였다. 일반적으로 같은 개체 수에서 염기보다는 산성일수록 암모니움 이온의 수가 상대적으로 증가하게 된다. 6b를 보면 산성일수록 낮은 농도에서도 단백질이 고정화되는 것을 볼 수 있다. 그러므로 본 발명은 다양한 단백질을 고정화시킬 수 있으며 그 응용성이 많다고 할 수 있다.

도 7은 단백질을 묶힌 용액의 이온영향을 테스트한 결과로, 즉 용액의 이온의 농도와 종류에 따라 단백질이 기질에 고정화에 영향을 줄 수 있다. 이 실험에 사용한 단백질은 CEA 단일클로날항체에 형광을 붙여 실험에 사용하였다. 사용한 이온은 NaCl의 Na^+ 이온과 NH_4Cl 의 NH_3^+ 이온을 사용하였다.

7a는 Na^+ 이온의 영향을 테스트한 결과로 단백질의 고정화에 영향을 주지 않지만 7b의 경우 NH_3^+ 이온의 농도에 따라 단백질의 고정화에 영향을 주는 것을 알 수 있다. 즉 캘릭스크라운이 암모니움 이온과 상호작용을 한다는 증거라고 할 수 있다.

캘릭스 크라운 유도체와 이와 같이 고체 기질 표면에서 크라운 그룹과 양이온간에 분자인식을 통한 단백질 고정화는 단백질에 화학적인 처리와 같은 부수적인 과정 없이 단백질을 손쉽게 고정화시킬 수 있다. 또한 크라운 그룹과 단백

질의 암모니움 이온간의 인식작용은 자발적인 것이기 때문에 빠르고 쉽게 일어난다. 따라서 본 발명품을 이용, 단백질을 고정화시키는 경우 기존의 사용했던 단백질 양보다도 현저히 적은 양으로 빈자리 없이 고정화시킬 수 있기 때문에 기존의 방법 등에서 문제가 되었던 비특이성 반응을 막을 수 있을 뿐만 아니라 훨씬 더 좋은 효과를 얻을 수 있다.

도 8은 세 종류의 다른 단백질을 사용하여 항원, 항체 반응을 테스트한 결과이다. 비특이성 반응 없이 각각의 짝이 되는 단백질에서만 발현하는 것을 알 수 있다

단백질 양이온의 인식을 기본으로 한 본 발명은 기존의 화학결합을 통한 단백질 고정화보다는 상대적으로 결합세기가 크지 않다. 그러므로 단백질의 변성을 최소화하여 그 본래의 활성도를 최대로 유지시킬 수 있는 환경을 제공한다. 그래서 기질 표면에 고정된 1차 단백질(primary protein)과 분석 단백질(analytic protein)간의 상호 작용을 원활하게 일어날 수 있다.

배향성 문제의 경우 대부분의 항원(antigen), 항체(antibody) 즉 단백질들의 암모니움 이온 잔기들이 단백질간의 상호작용을 하는 활성자리 반대쪽에 있기 때문에 해결할 수 있다.

본 발명은 기존의 방법들이 가지고 있는 문제점들을 획기적으로 개선한 것으로 측정 범위가 매우 높다. 다시 말하면 기존의 방법으로는 측정 범위가 ng-pg/ml이었지만 본 발명품으로 테스트해 본 결과 fg/ml까지 아주 낮은 농도에서도 측정이 가능하다.

이하, 비한정적인 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다.

실시예 1

기질 A 제조법

유리(슬라이드 글라스)를 piranha 용액($H_2SO_4:H_2O_2=3:1$)에서 80도의 온도를 유지시키며 유리끼리 서로 겹쳐서 불지 않은 상태에서 1시간 동안 담가 두었다가 유리를 빼서 찬물로 30분동안 씻어준 후 2차 증류수로 닦고 다시 아세톤으로 닦아준 뒤 질소가스로 불어주어서 건조시킨다. 이 기질을 무수 메탄올이나 또는 에탄올 200ml에 3-아미노프로필트리에톡시실란 (3-aminopropyltriethoxysilane) 25g을 녹이고 이 용액에 위에서 닦은 깨끗한 유리를 담고 25도의 온도에서 유리끼리 서로 겹쳐서 불지 않은 상태에서 12시간동안 처리하였다. 이 유리를 에탄올, 2차 증류수 그리고 아세톤 순으로 씻은 후 질소나 아르곤으로 건조시킨 후 120도의 온도가 유지되는 오븐 안에서 30분 가량 놓아 두었다. 다시 이 기질을 톨루엔과 메탄올혼합용액(톨루엔:메탄올=1:1)에 담고 2분 동안 초음파진동(sonication)시켰다. 다시 탄올, 2차 증류수 그리고 아세톤으로 씻어준 후 질소나 아르곤으로 건조시켰다(도 2참조).

기질 B 제조법

기질 A가 금인 경우 무수 클로로포름 100ml에 캘릭스 크라운 유도체(도 1, 1b) 216mg이 녹아 있는 용액에 담고 25도의 온도를 유지시키면서 반응시켰다. 기질 A가 위에서 제조한 유리인 경우 캘릭스 크라운 유도체(도 1, 1c) 211mg을 무수 클로로포름 100ml에 녹여 5시간 동안 반응시킨 후 이 기질들을 클로로포름, 에탄올, 2차 증류수 그리고 아세톤으로 순서대로 씻어 준 다음 질소로 건조시켰다(도 2참조).

단백질 단분자층(기질 C) 제조법

기질 B를 단백질 100 μ g/ml 농도의 단백질 수용액(글리세롤 30%함유)에 원하는 위치에 떨어뜨린 후 3시간 동안 넣어둔 후 인산염 완충식염수(PBS)에 트윈20 0.5% 함유된 용액으로 세척하면 단백질 단분자층이 제조된다(도 2참조).

실시예 2

단백질 고정화 테스트

실험방법은 위에서 제조된 캘릭스 크라운 단분자층(기질 B)에 마이크로어레이어로 단백질을 스팟팅하여 실험하였다. 모든 실험에 사용된 완충용액은 PH=7.4, 인산 0.01M, 염화나트륨 (NaCl) 0.138M, 염화칼륨(KCl) 0.0027M, 그리고 글리세롤 30%가 함유된 완충용액을 사용하였다.

실험방법은 아래와 같다.

1. 기질 B에 각종 암에 표시인자로 나타나는 단백질인 CEA 단일클로날항체에형광물질인 Cy-5을 붙여 이것을 100 μ g-1fg/ml까지 10분 1씩 농도를 낮추어 마이크로어레이로 스팟팅한 후 37도, 습도가 75%이상인 오븐에서 3시간동

안 반응을 시켰다.

2. PBS-0.5% 트윈 완충용액에 10분정도 담귀 세척한 후 형광스캐너로 단백질의 고정화 정도를 관찰하였다.

실험 결과는 도면 3과 같았다. 농도에 따른 형광의 상대적 세기를 그래프로 도식하면 선형으로 나타남을 알 수 있다. 이것으로 한계측정 농도가 1fg/ml까지임을 알 수 있었다(도 3참조).

실시에 3

항원-항체반응 테스트

실험방법은 위에서 제조된 캘릭스 크라운 단분자층(기질 B)에 마이크로어레이어로 단백질을 스팟팅하여 실험하였다.

실험방법은 아래와 같다.

1. 기질 B에 많은 양에 표시인자로 나타나는 단백질인 CEA 단일클로날항체 100 μ g/ml의 농도의 용액에서 마이크로어레이를 이용 5X12로 스팟팅 하고(한 열은 음성 대조군으로 블로킹 용액인 3% BSA (bovin serum albumin) 완충용액을 스팟팅) 37도, 습도가 75%이상인 오븐에서 1시간 넣어 두었다. PBS-0.5% 트윈 완충용액에 10분정도 담귀 세척하였다.

2. 비특이적 반응을 막기위해 3% BSA 완충용액에 기질을 1시간 담귀 두었다. PBS-0.5% 트윈20 완충용액에 10분정도 담귀 세척하였다.

3. 세척 후 형광물질인 Cy-5가 붙어있는 분석 단백질인 CEA 항원을 100 μ g-1fg/ml까지 10분 1씩 농도를 낮추어 마이크로어레이로 스팟팅한 후 37도, 습도가 75%이상인 오븐에서 1시간동안 반응을 시켰다.

4. PBS-0.5% 트윈 완충용액에 10분정도 담귀 세척한 후 형광스캐너로 항원-항체 반응결과를 관찰하였다.

실험 결과는 도면 4과 같았다. 농도에 따른 형광의 상대적 세기를 그래프로 도식하면 선형으로 나타남을 알 수 있다. 이것으로 한계측정 농도가 1fg/ml까지임을 알 수 있었다(도 4참조).

실시에 4

β -HCG을 이용한 샌드위치 방법

1. 유리 기질 B에 자궁암에 표시인자로 나타나는 단백질인 β -HCG(Human Chorionic Gonadotropin, 용모상피암) 단일클로날항체(20) 100 μ g/ml의 농도의 용액에서 마이크로 피펫을 이용하여 기질 위에 0.5 μ l 떨어뜨린 후, 37도, 습도가 75%이상인 오븐에서 4시간에서 12시간 동안 넣어 둔다. PBS-0.5% 트윈 완충용액에 10분정도 담귀 세척하였다.

2. 비특이적 반응을 막기위해 3% BSA 완충용액에 기질을 1시간 담귀 둔 후 PBS-0.5% 트윈 완충용액에 10분정도 담귀 세척하였다.

3. 세척 후 환자 혈액 속에 존재하여 분석에 표본 단백질인 β -HCG 항원(21)을 글리세롤 30%가 포함된 완충용액에 1 μ g-1fg/ml까지 10분 1씩 농도를 낮추어 각 농도별로 마이크로 피펫으로 β -HCG 단일클로날항체(20)를 떨어뜨린 곳에 0.5 μ l 떨어뜨린 후, 37도, 습도가 75%이상인 오븐에서 1시간 동안 넣어 반응시킨 후 PBS- 0.5% 트윈 완충용액에 10분정도 담귀 세척하였다.

4. β -HCG 폴리클로날항체(22) 5-2.5 μ g/ml 농도로 0.5 μ l 떨어뜨린 후, 37도, 습도가 75%이상인 오븐에서 1시간 동안 넣어 반응시킨 후 PBS-0.5% 트윈 완충용액에 10분정도 담귀 세척하였다.

5. 면역글로불린G(23)에 형광(24)을 부착한 후 5-2.5 μ g/ml 농도로 0.5 μ l 떨어뜨린 후, 37도, 습도가 75%이상인 오븐에서 10분 동안 넣어 반응시킨 후 PBS-0.5% 트윈 완충용액에 10분정도 담귀 세척하였다.

6. 형광스캐너를 이용하여 단백질간의 발현패턴을 분석 상대적 형광의 세기를 분석하였다.

실험 결과는 도면 5의 5b, 5c와 같았다. 형광 세기를 보면 음성인 부분인 양성인 부분보다는 형광의 세기가 약하게 나타나며, 항원의 농도에 따라 형광의 세기가 다름을 알 수 있었다. 이러한 결과를 수치로 계산하여 그래프를 얻으면 4c

와 같았다. 농도별도 1fg/ml까지 선형으로 나타나므로 본 발명의 검출한계가 1fg/ml까지임을 증명하는 결과임을 알 수 있었다(도 4참조).

실시예 5

CEA, CA19-9, 인터루킨 단백질을 사용한 샌드위치 방법

실시예 4와 같은 방법으로 암의 표지인자인 CEA, CA19-9, 싸이토카인 일종인 인터루킨-2(IL-2), 인터루킨-6(IL-6), 인터루킨-8(IL-8) 등의 단백질을 사용하여 실시예 4와 같은 방법인 샌드위치 방법으로 단백질간의 발현패턴을 분석, 상대적 형광의 세기를 분석하였다.

실험결과와 표와 같다. 항원의 농도에 따라 형광의 세기가 단백질 별로 10fg/ml - 1fg/ml까지 검출한계를 나타내고 있다 (표 1참조).

[표 1] 항원의 농도에 따른 형광의 세기

농도 단백질 (ng/ml)	IL-2	IL-6	IL-8	CEA	CA19-9
1×10^5				1	1
1×10^4		1		0.912555	0.998326
1×10^3	0.97645	0.99454		0.793881	0.90048
1×10^2	0.95596	0.94452		0.764249	0.720146
1×10^1	0.85607	0.81994		0.702004	0.689427
1	0.89635	0.64296	1.03826	0.552133	0.539568
1×10^{-1}	0.80171	0.50844	0.77942	0.452767	0.448743
1×10^{-2}	0.76595	0.38152	0.68196	0.370946	0.388949
1×10^{-3}	0.50797	0.27064	0.42983	0.276674	0.316238
1×10^{-4}	0.3293	0.18085	0.34553	0.16876	0.264377
1×10^{-5}	0.26319	0.0933	0.25256	0.08444	0.263776
1×10^{-6}	0.09208	0.04109	0.10593	0.05232	0.201252

실시예 6

산· 염기 테스트

본 발명품의 캘릭스 크라운 유도체의 크라운과 단백질의 암모늄 양이온과의 상호작용(6a), 즉 분자인식을 이용한 것이다. 그러므로 산· 염기에 따라 처음 단백질(capture protein)의 양이 많이 달라진다.

도면 6b는 산· 염기 변화에 따른 본 발명품 위에서 단백질의 농도에 고정화 정도를 테스트한 실험이다. 사용한 단백질은 간암의 표지인자인 CEA 단일클로날항 체에 형광물질인 Cy-5을 붙여 완충용액의 산· 염기도(pH = 3 - 12)와 단백질의 농도($10\mu\text{g}$ -1fg/ml) 변화를 주어 실험하였다. 실험방법은 아래와 같다.

1. 각기 다른 산· 염기를 가진 완충용액에 단백질, CEA 단일클로날항체-Cy5을 농도별로 희석하였다.
2. 마이크로어레이를 사용 농도별로 스팟팅한 후 온도가 37도, 습도가 75% 이상인 오븐에서 3시간동안 넣어 두었다.
3. PBS-0.5% 트윈 완충용액에 10분정도 담귀 세척하였다.
4. 형광스캐너를 이용하여 단백질간의 발현패턴을 분석 상대적 형광의 세기를 분석하였다.

일반적으로 암모늄 양이온은 pH = 7에서 대부분이 양이온으로 존재한다. 중성(pH = 7)에서 염기도가 높아질수록(pH = 9 - 12) 상대적으로 암모늄 양이온이 점차적으로 줄어들고 대신 음이온(NH_3^-)이 증가하게 된다. 그러므로 도면 5b에서 보는 것처럼 낮은 농도에서는 형광의 강도가 중성일 때보다는 약하거나 전혀 나타나지 않게 된다. 반대로 산도가 높아질수록(pH = 5 - 3) 중성일 때보다는 암모늄 양이온(NH_3^+)이 증가하게 되어 낮은 농도에서도 강한 형광 강도가 나타나게 되며 또한 검출한계도 낮은 농도까지 가능하게 된다.

이 결과는 본 발명에 쓰인 캘릭스 크라운 유도체의 크라운화합물과 단백질의 암모늄 양이온과 상호작용을 증명해주는 실험이다(도 6참조).

실시예 7

이온영향 테스트

본 발명의 캘릭스 크라운 유도체는 단백질의 암모늄 양이온과의 상호작용, 즉 분자인식을 이용하여 단백질을 기질 위에 고정화시키는 기술이다.

단백질을 묶힌 용액의 이온의 농도와 종류에 따라 단백질이 기질에 고정화에 영향을 줄 수 있다. 이 실험에 사용한 단백질은 CEA 단일클로날항체에 형광을 붙여 실험에 사용하였다. 사용한 이온은 NaCl의 Na^+ 이온과 NH_4Cl 의 NH_3^+ 이온을 사용하였다.

일반적인 임상실험에 사용하는 완충용액에 포함된 Na^+ 이온과 캘릭스 크라운 유도체와 단백질간에 반응하는 암모늄 이온을 가지고 있는 NH_4Cl 의 농도에 변화, 즉 0, 0.5, 1.0 몰농도(M)에 변화를 주었으며 단백질의 농도변화를 주어 단백질 고정화에 어떤 영향을 주는가를 실험하였다. 실험방법은 다음과 같은 방법으로 실험하였다.

1. 실험에 사용할 완충용액을 NaCl을 사용 농도를 0, 0.15, 그리고 1 몰농도의 용액을 만들고, 다른 완충용액을 NH_4Cl 을 녹여 0, 0.5, 그리고 1 몰농도의 용액을 만들었다.
2. 1 과정에서 준비된 각각의 완충용액으로 CEA 단일클로날항체를 농도별(1 $\mu\text{g/ml}$ ~ 1fg/ml)로 희석하였다.
3. 마이크로레이를 사용하여 각기 칩마다 이온의 종류와 농도를 달리하여 단백질의 농도별로 스팟팅한 후 온도가 37도, 습도가 75% 이상인 오븐에서 3시간동안 넣어 두었다.
4. PBS-0.5% 트윈 완충용액에 10분정도 담궈 세척하였다.
5. 형광스캐너를 이용하여 단백질간의 발현패턴을 분석 상대적 형광의 세기를 분석하였다.

결과를 보면 도면 7a에서 보는 것과 같이 Na^+ 이온의 농도변화 0, 0.15, 그리고 1.0 몰농도(M)의 Na^+ 이온이 완충용액에 존재하는 경우나 없는 경우 단백질이 고정화되는데 영향을 주지 않는다. 즉 크라운 링에 단백질의 암모늄 이온이 상대적으로 더 잘 결합된다는 것을 알 수 있다. 하지만 용액에 NH_4Cl 이 녹아있는 경우, 즉 도면 7b에서 처럼 용액에 단백질에 존재하는 암모늄 이온보다 상대적으로 자유로운 NH_3^+ 이온이 존재하여 단백질이 기질에 고정화되는 것을 방해하게 되므로 낮은 단백질의 농도에서는 NH_4Cl 이 없는 경우보다 상대적으로 결합이 더 잘 안 된다는 것을 확인할 수 있었다.

이 결과는 본 발명에 쓰인 캘릭스 크라운 유도체의 크라운화합물과 단백질의 암모늄 양이온과 상호작용을 증명해주는 간접적인 실험결과이다 (도 7참조).

실시예 8

비특이성 테스트

본 발명과 같은 단백질 칩들이 가지고 있어야 조건 중에 하나가 비특이성 반응이 없어야 한다. 즉 항원-항체의 상호작용을 이용하는 경우 같은 항원- 항체끼리는 반응을 잘하고 서로 다른 이종의 항원- 항체끼리는 반응이 일어나지 않아야 한다. 이러한 것을 좌우하는 요인으로서는 처음 고정화되는 단백질(capture protein)이 고밀도로 고정화되고 방향성 또한 이차적으로 반응하는 단백질과 반응할 수 있는 자리가 위로 잘 나와 있어야 한다.

이 실험에 사용한 단백질은 대부분에 암의 표시인자인 CEA, 간암의 표시인자인 CRP, 그리고 전립선암의 표시인자인 PSA의 항원- 항체를 사용하였다.

1. 본 발명품에 세 단백질의 단일클로날항체를 완충용액으로 100 μ g/ml의 농도를 묶힌 후 마이크로어레이를 사용, 각각의 단백질을 2×2로 3장에 스팟팅하고 37도 습도가 75%이상인 오븐에서 1시간 넣어 두었다. PBS-0.5% 트윈 완충용액에 10분정도 담궈 세척하였다.
2. 비특이적 반응을 막기위해 3% BSA 완충용액에 기질을 1시간 담궈 두었다. PBS-0.5% 트윈 완충용액에 10분정도 담궈 세척하였다.
3. 세척 후 형광물질인 Cy-5가 붙어있는 분석 단백질의 항원 10ng/ml을 한 장에는 CRP 항원만, 다른 한 장에는 CE A 항원, 그리고 나머지 한 장에는 PSA 항원을 1과정에서 스팟팅 한 곳에 마이크로어레이로 스팟팅한 후 37도, 습도가 75%이상인 오븐에서 1시간동안 반응을 시켰다.
4. PBS-0.5% 트윈 완충용액에 10분정도 담궈 세척한 후 형광스캐너로 항원- 항체 반응결과를 관찰하였다.

실험 결과는 도면8과 같았다. 각 단백질의 항원· 항체들은 비특이성 반응 없이 맞는 쌍이 되는 항원· 항체 반응이 일어남을 알 수 있었다(도 8참조).

발명의 효과

이상과 같은 본 발명은 다음과 같은 효과를 갖는다.

먼저, 기존의 것보다 측정 한계가 매우 낮으므로 기존의 방법으로는 알 수 없었던 새로운 단백질을 찾아낼 수 있고 이들의 특징을 알아냄으로서 생명공학 분야에 새로운 틀을 마련할 수 있다. 또한 질환진단과 같은 분야에서는 초기에 병의 진단이 가능해지므로 쉽게 병을 치료하고 관리가 가능하다.

둘째로, 아주 적은 단백질 양만을 사용하기 때문에 기존의 이용했던 것보다 많은 비용 면에서 절감효과가 가능하고 또한 그 결과도 기존의 것보다 훨씬 좋은 결과를 얻을 수 있다.

셋째로, 응용범위가 넓다. 다양한 캘릭스 크라운 유도체에 따라 각 종의 고체 기질을 사용할 수 있으므로 사용하는 측에 따라 응용이 가능하다.

넷째로, 일반 슬라이드 유리판에서 수천-만개의 단백질을 고정화시킬 수 있으므로 멀티(multi) 측정이 가능하고 기존의 것으로 여러번 테스트할 것을 한번에 가능하다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

- a) 유리, 금, 플라스틱, 실리콘 와퍼 및 금속으로 구성된 군으로부터 선택된 하나의 기질;
- b) 상기 기질 표면에 형성된 캘릭스 크라운 유도체; 및
- c) 상기 캘릭스 크라운 유도체 상에 고정된 단백질을 포함하는 단백질 칩.

청구항 2.

제 1 항에 있어서,

상기 캘릭스 크라운 유도체는 도 1a의 구조를 갖는 것을 특징으로 하는 단백질 칩.

청구항 3.

제 1 항 및 제 2 항 중 임의의 한 항에 있어서,

상기 캘릭스 크라운 유도체는 화학식 1b 또는 1c인 것을 특징으로 하는 단백질 칩.

청구항 4.

제 1 항에 있어서,

상기의 단백질은 항체, 효소 또는 펩타이드인 것을 특징으로 하는 단백질 칩.

청구항 5.

제 4 항에 있어서,

상기의 항체는 단일클로날 항체인 것을 특징으로 하는 단백질 칩.

청구항 6.

제 4 항 및 제 5 항 중 임의의 한 항에 있어서,

상기의 단백질은 CEA, CA19-9, 사이토카인으로 구성된 군으로부터 선택된 하나의 단백질인 것을 특징으로 하는 단백질 칩.

청구항 7.

a) 유리, 금, 플라스틱, 실리콘 와퍼 및 금속으로 구성된 군으로부터 선택된 하나의 기질 표면에 형성된 캘릭스 크라운 유도체를 처리하는 단계; 및

b) 상기 캘릭스 크라운 유도체 상에 단백질을 고정하는 단계를 포함하는 단백질 칩 제조방법.

청구항 8.

제 7 항에 있어서,

상기 캘릭스 크라운 유도체는 도 1a의 구조를 갖는 것을 특징으로 하는 단백질 칩 제조방법.

청구항 9.

제 7 항 및 제 8 항 중 임의의 한 항에 있어서,

상기 캘릭스 크라운 유도체는 도 1b 또는 도 1c인 것을 특징으로 하는 단백질 칩 제조방법.

청구항 10.

제 7 항에 있어서,

상기의 단백질은 항체, 효소 또는 펩타이드인 것을 특징으로 하는 단백질 칩 제조방법.

청구항 11.

제 10 항에 있어서,

상기의 항체는 단일클로날 항체인 것을 특징으로 하는 단백질 칩 제조방법.

청구항 12.

제 10 항 및 제 11 항 중 임의의 한 항에 있어서,

상기의 단백질은 CEA, CA19-9, 사이토카인으로 구성된 군으로부터 선택된 하나의 단백질인 것을 특징으로 하는 단백질 칩 제조방법.

청구항 13.

a) 제 1항의 단백질 칩에 검사할 단백질을 반응시키는 단계;

b) 상기의 반응체에 형광이 부착된 물질을 처리하는 단계; 및

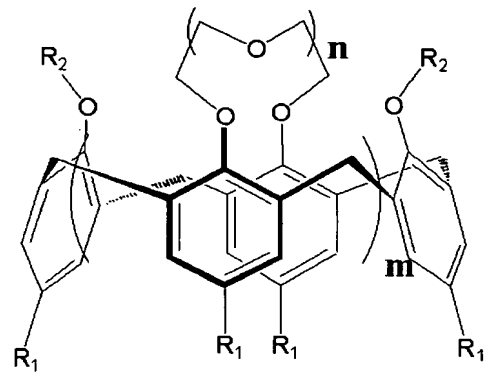
c) 상기의 형광을 검출하는 단계를 포함하는 단백질 발현 또는 단백질 간의 상호작용 감지방법.

청구항 14.

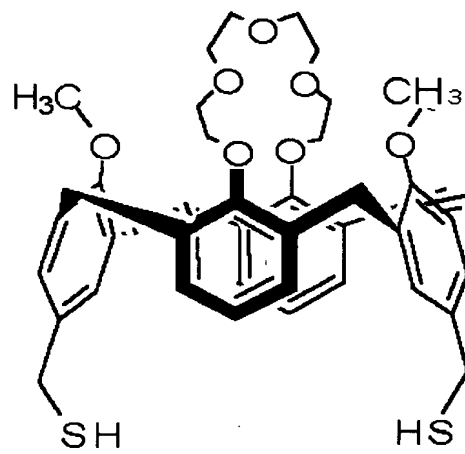
제 13 항에 있어서 상기의 단백질 칩은 단일클로날항체가 부착된 칩인 것을 특징으로 하는 감지방법.

도면

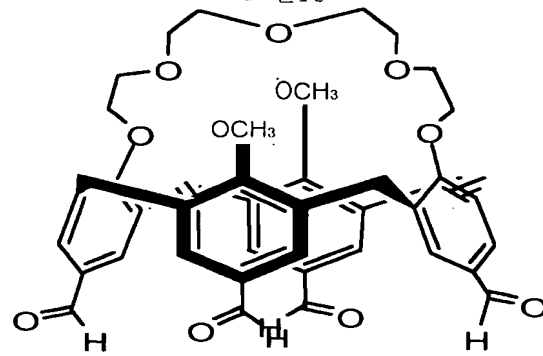
도면 1a

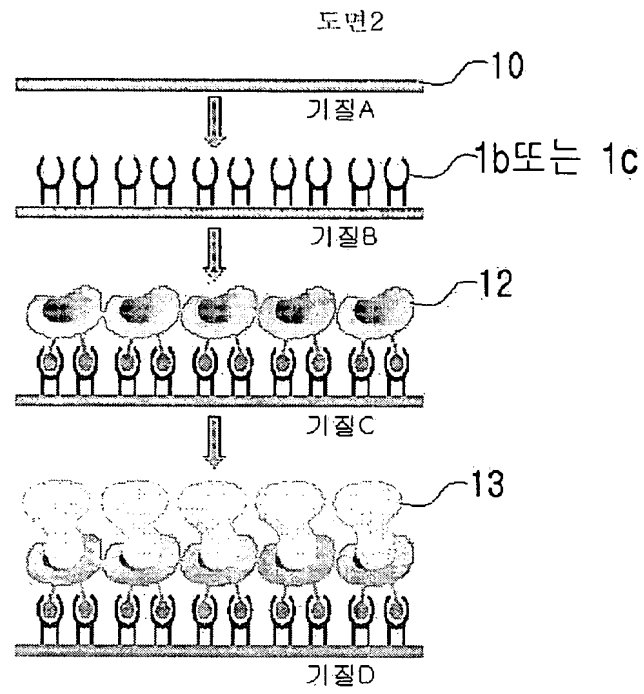


도면 1b



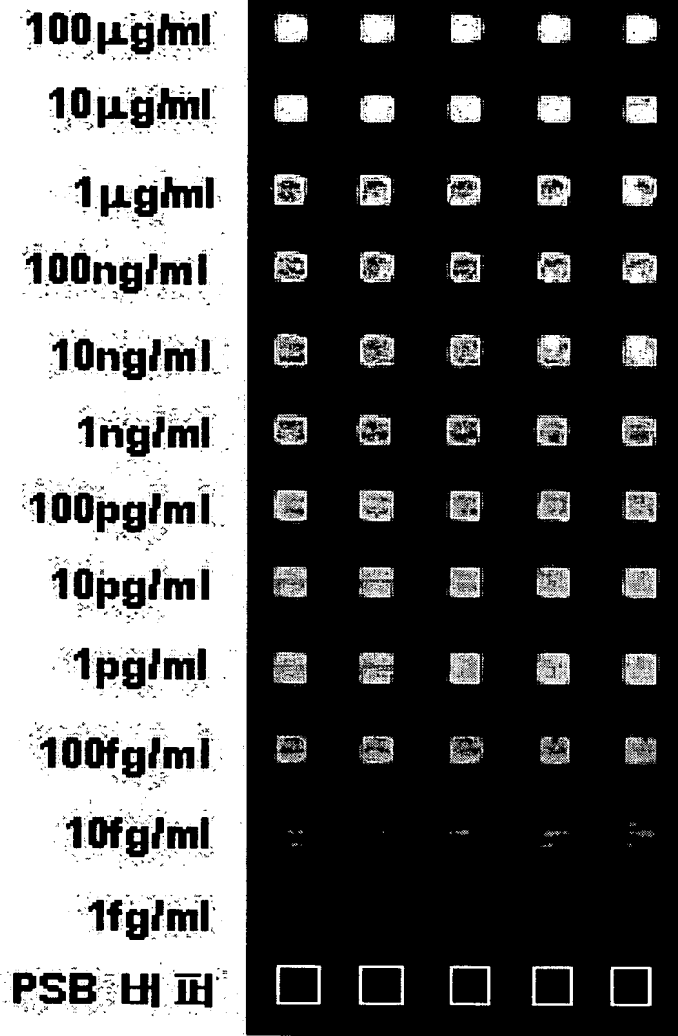
도면 1c



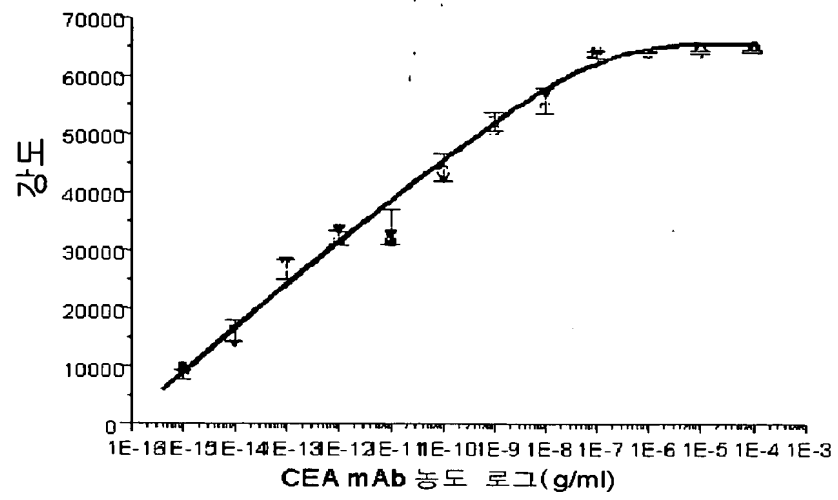


도면3a

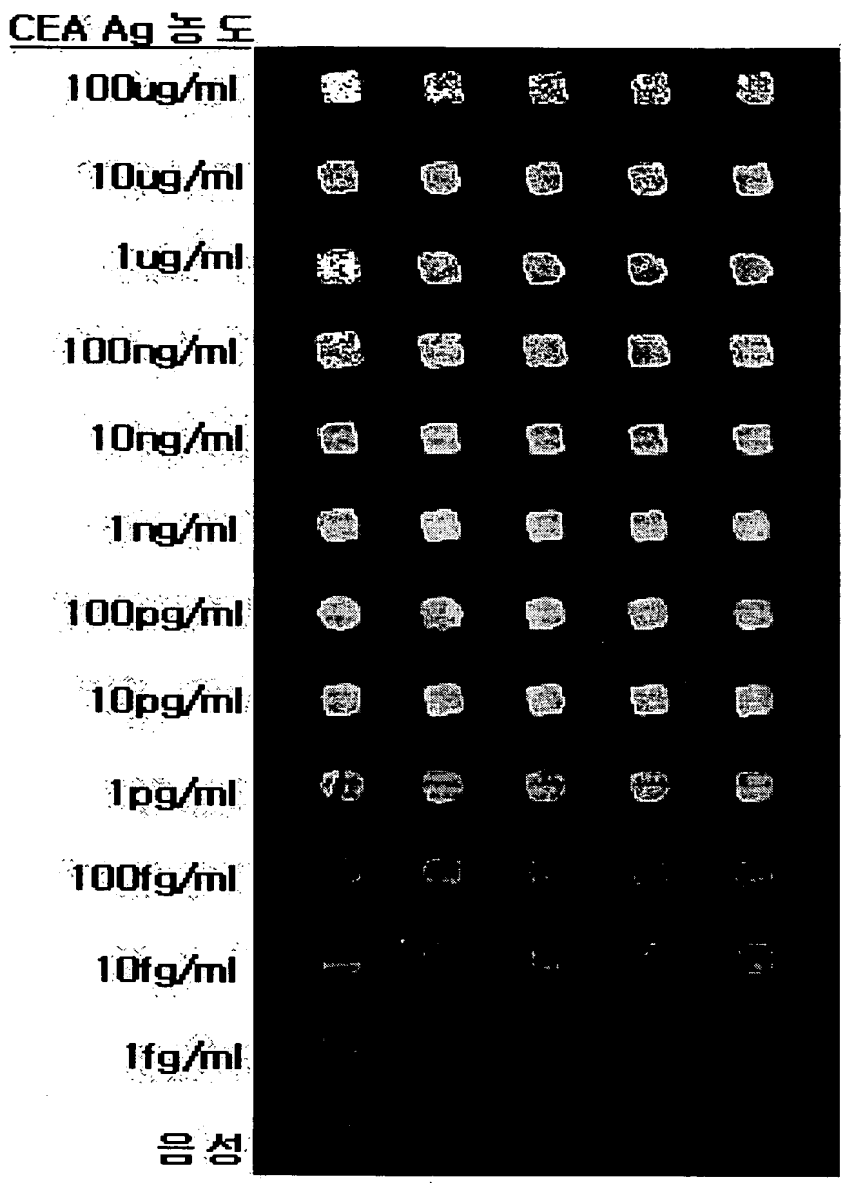
CEA mAb



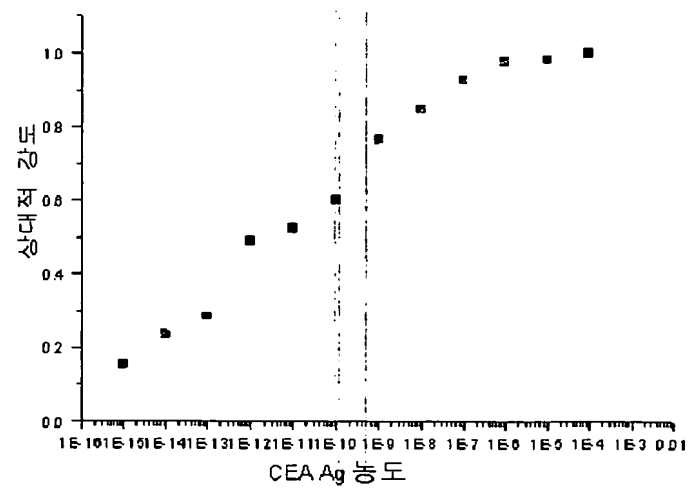
도면3b

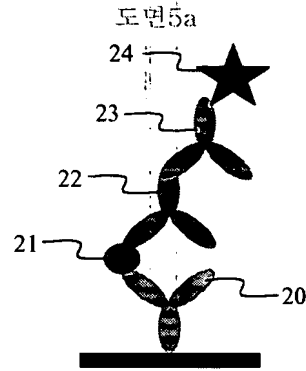


도면4a



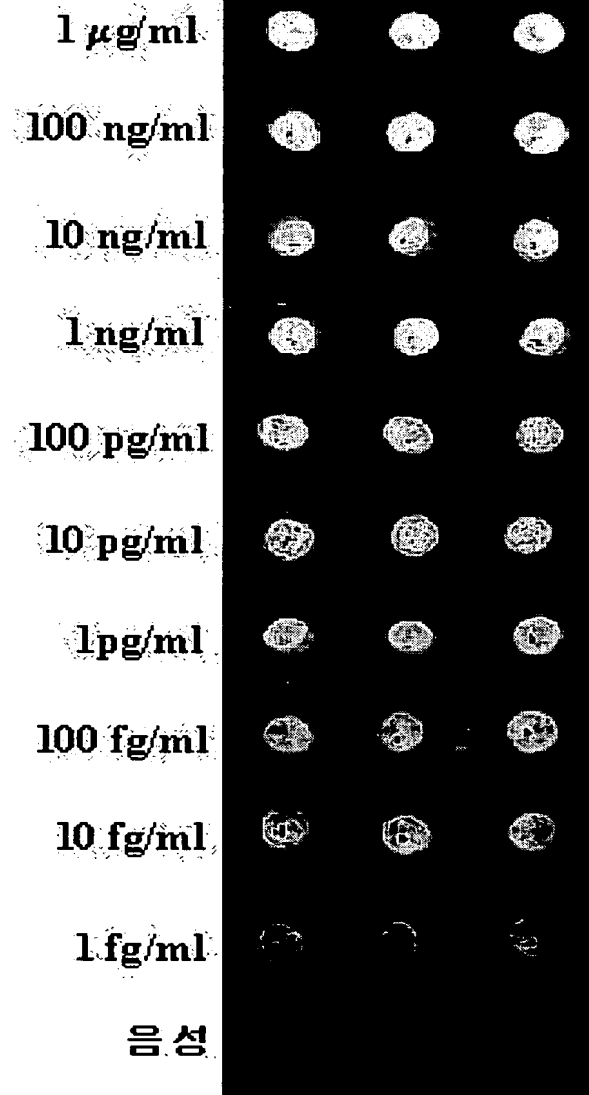
도면4b



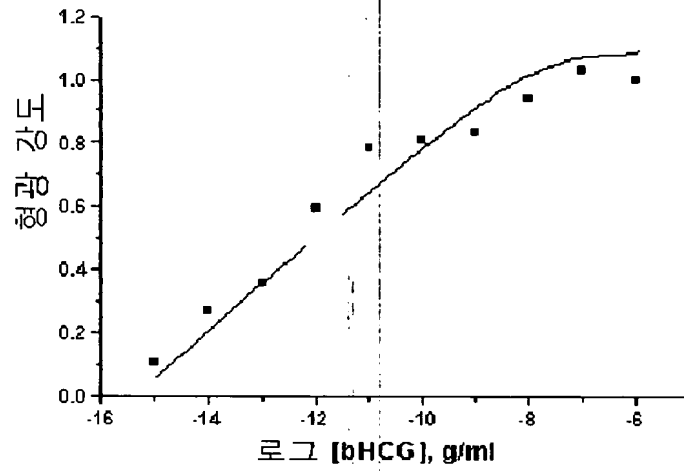


도면5b

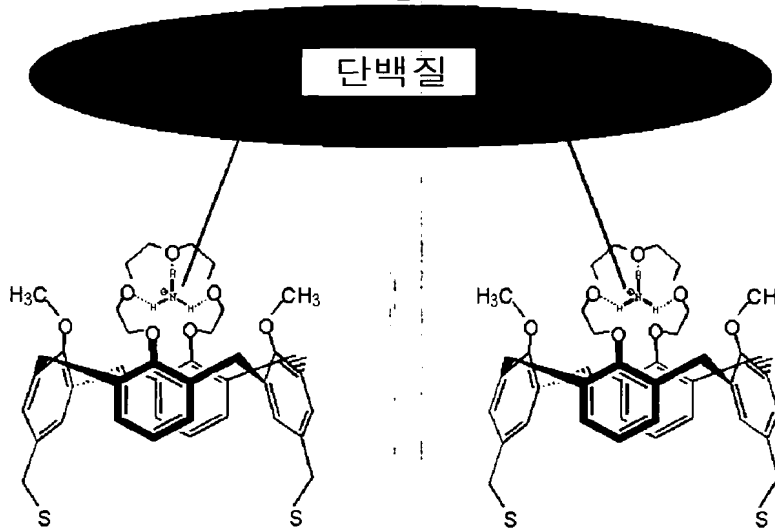
β -HCG Ag



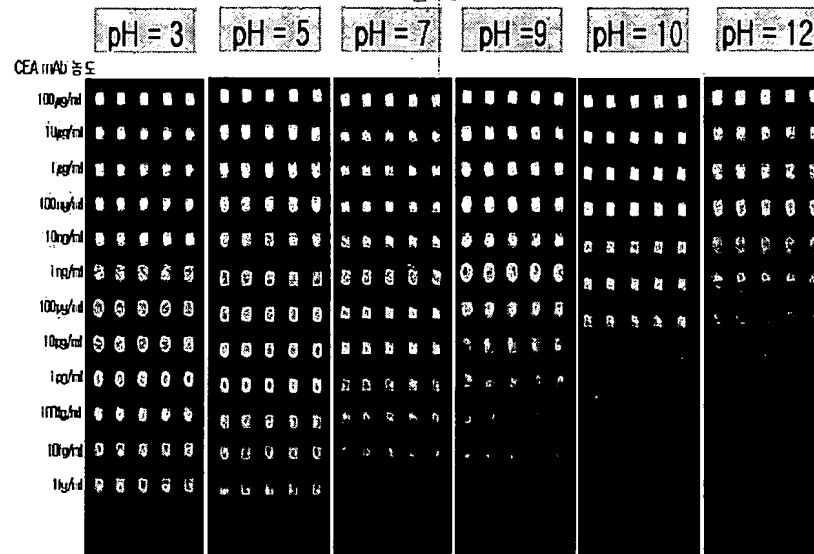
도면5c



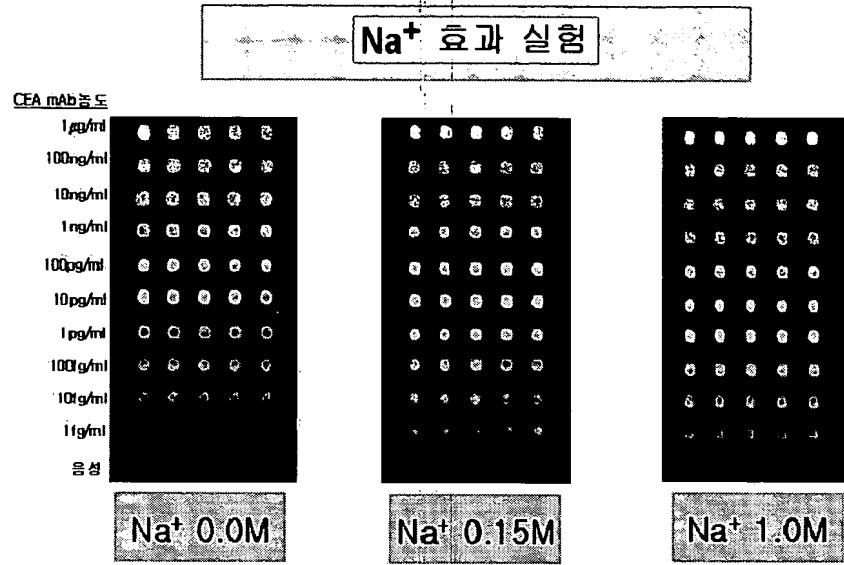
도면6a



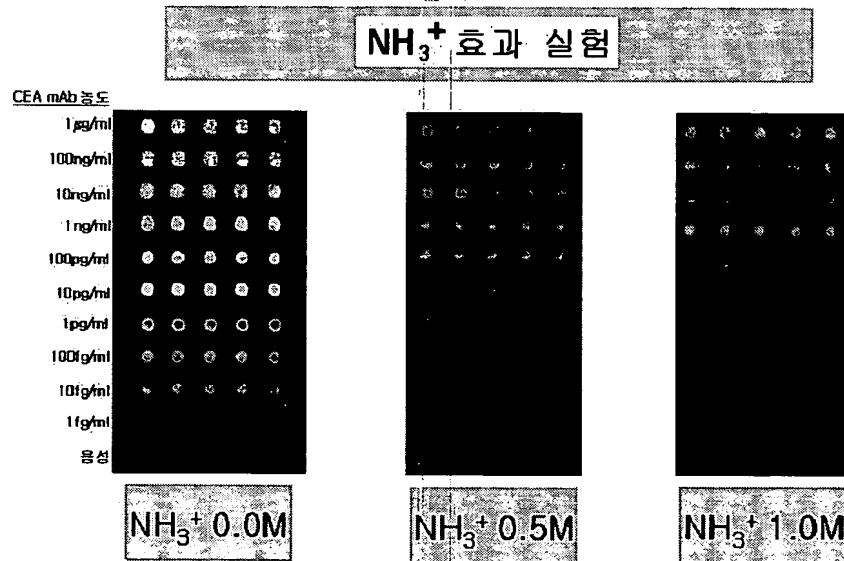
도면6b



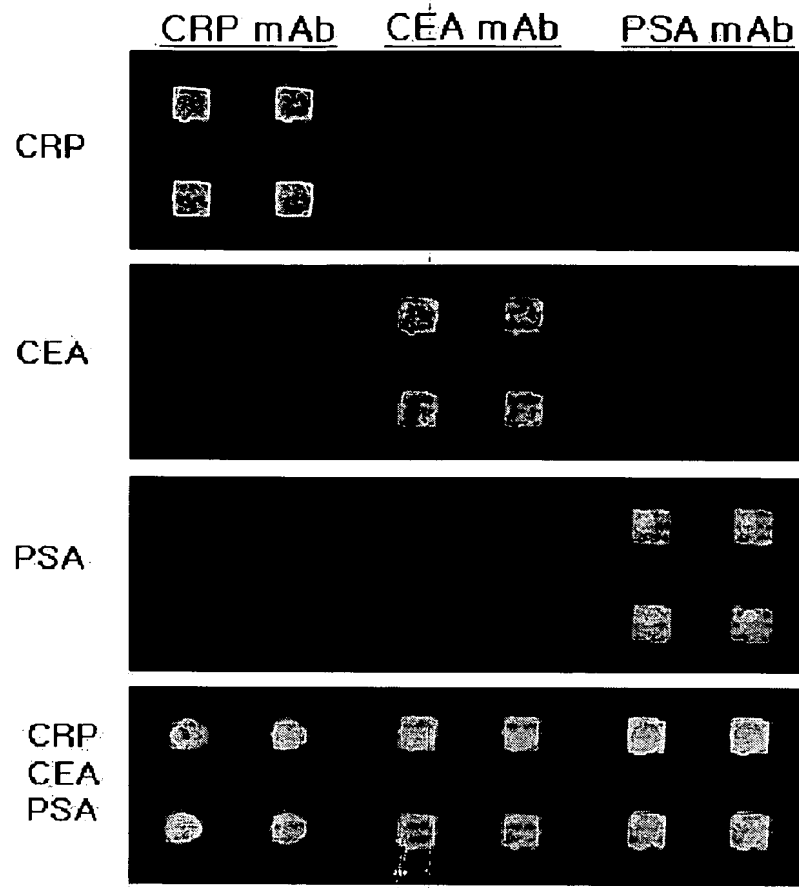
도면 7a



도면 7b



도면8



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER: _____**

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox